DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.03.011

对氯苯丙氨酸对大鼠海马胞液皮质酮受体数量的影响

袁 和 刘祚周 李希成（生理教研室）

提 要 本实验以([3H])皮质酮为配体，建立了去肾上腺大鼠海马胞液皮质酮受体的放射配体结合测定法，并对海马胞液皮质酮受体的结合特性以及对氯苯丙氨酸(pCPA)对皮质酮受体数量的影响进行了研究。测得的皮质酮受体具有可饱和性、有限的结合能力、高亲和力和高特异性的特征。Scatchard分析为一直线，表明测得的皮质酮受体是一个或一组kd值十分接近的受体。侧脑室注射pCPA 1mg 4天后，海马5-HT含量明显降低，同时海马胞液皮质酮受体的最大结合容量(Bmax)显著升高，提示海马5-HT能神经元的功能性活动在控制海马胞液皮质酮受体数量的相对恒定中具有重要作用。

关键词 海马；皮质酮；受体；5-HT；pCPA；放射配体结合测定

70年代初McEwen等人应用同位素示踪、放射自显影术及放射配体结合分析法证明，脑内皮质酮受体集中分布于海马[1]。目前认为，海马皮质酮受体的功能可能和动物的行为及皮质酮分泌的调节有关[2]。近年来研究表明，海马皮质酮受体的数量受脑内多种激素和神经递质的调节，Dekloet等人将其归纳为以下四类：（1）受体的固有配体，如皮质酮；（2）其它类固醇激素，如睾酮；（3）多肽类激素，如加压素、ACTH；（4）经典神经递质，如NE，5-HT[3]。就现有资料看来，在上述因素中以5-HT对海马皮质酮受体数量的影响较为突出[4]。

关于海马皮质酮受体的研究，迄今国内尚未见报道。本工作以[^{3}H]皮质酮为放射性配体研究了大鼠海马胞液皮质酮受体的结合特性及对氯苯丙氨酸（pCPA）对大鼠海马胞液皮质酮受体数量的影响。

材料和方法

一、材料

[^{3}H]皮质酮（[^{3}H]B）：由上海内分泌研究所提供，比放射性为50ci/mmol。实验前经放射层析扫描鉴定放化纯度为95.3%。

对氯苯丙氨酸(pCPA)：为英国Koch-Light产品。

动物：大鼠，体重200-250g，雌雄不拘。

二、方法

1. 侧脑室注射：动物在戊巴比妥钠腹腔麻醉下，按Bures大鼠图谱，在双侧脑室(p1.5, RL1.5, H3.5)埋置导管各一个，于每侧脑室缓慢注入药液或生理盐水（NS）10μl。部分动物取脑作组织切片，以鉴定导管尖端所在部位。

2. 海马胞液皮质酮受体的最大结合容量(Bmax)和平衡解离常数(kd)的测定法：每次实验取去肾上腺48小时的大鼠5～7只，经主动脉灌注冷的生理盐水50～70ml后，断头，分离出双侧海马，于定量Tris-HCl缓冲液内制备成匀浆，取部分匀浆推片，经光学显微镜检查，显示核大部分完整，呈“裸核”样。匀浆经高速离心(100 000×g，4℃，1小时）后，取其上清（胞液）。用福林-酚试剂法测胞液蛋白浓度，将胞液蛋白浓度稀释成0.8～1.2mg/0.2ml。受体测定的加样程序见表1，各测定管均为双重复管。

表1 海马胞液皮质酮受体放射配体结合测定加样程序

	总结合管（B管）	非特异结合管（A管）	总管（T管）
[^{3}H]B皮质醇	0.2～5nM /	0.2～5nM 2μM	0.2～5nM /
水浴45℃，压缩空气吹干			
胞液	0.2ml	0.2ml	0.2ml
匀浆缓冲液	/	/	/
摆匀，冰浴中4～5小时			
包膜活性炭液	0.2ml	0.2ml	0.2ml
生理盐水	/	/	/

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

按表1加样完毕后，摇匀，静置10分钟，离心2500rpm，10分钟，取上清0.2ml加入到10ml的闪烁液内摇匀成匀相，用LKB-1217液闪计数仪，经外标准道比淬灭校正法测算出各管实有放射量dpm值。

受体测定结果的计算[5][6]：

特异结合值（B）dpm＝总结合值（B管）dpm－非特异结合值（A管）dpm。

游离值（F）dpm＝加入〔^{3}H〕B总量（T管）dpm－总结合值（B管）dpm。

Scatchard作图中B与F的计算及表示单位：

$$B\ (fmol/mg\cdot Prot) = Bdpm \times \frac{1nci}{2.22\times10^{9}dpm} \times \frac{1pmol[^3H]B}{50nci} \times \frac{1}{0.8-1.2mg\cdot Prot} \times 1000$$

$$F\ (nM) = Fdpm \times \frac{1nci}{2.22\times10^{9}dpm} \times \frac{1pmol[^3H]B}{50nci} \times \frac{1}{0.2ml}$$

根据Scatchard作图，经直线回归分析，计算〔^{3}H〕B特异结合受体的Bmax及kd值。

3．不同类固醇对皮质酮受体的相对结合亲和力的测定：每次实验取去肾上腺大鼠10只，制备海马胞液。于A管内加入非标记皮质醇（最终浓度为2μM），B管内不加任何非标记类固醇，竞争结合管内分别加入皮质酮，皮质醇，孕酮，醛固酮和地塞米松，其最终浓度为1，5，10，50，200nM。各管内加入海马胞液0.2ml及〔^{3}H〕B（最终浓度为0.126nM）。冰浴5小时，加入包膜活性炭液0.2ml，离心后取上清，测dpm。以各竞争结合管内类固醇浓度的对数对〔^{3}H〕B结合的竞争抑制百分数作图，根据图中各类固醇对〔^{3}H〕B结合的50%的竞争抑制浓度（IC50），算出各类固醇对皮质酮受体的相对结合亲和力。

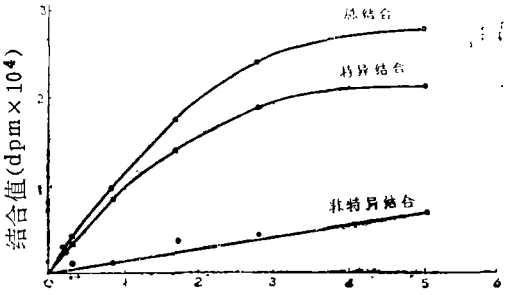
4．海马5-HT含量的荧光分光光度测定法：参照Curzon[7]等人方法进行。5-HT的回收率为80±5.9%。

5．统计学处理：本实验结果所得数据均为计量资料。实验与对照两组样本的均数的显著性检验采用双侧双样本t检验或双侧双样本Welch氏t检验。部分数据进行Scatchard分析，用直线相关的方法求一套数据中两项指标的相关系数，用t检验法检验其显著性，并做直线回归分析，求得直线回归方程。

结　果

一、去肾上腺大鼠海马胞液皮质酮受体的结合特性

1．〔^{3}H〕B浓度与受体结合的关系：在胞液蛋白含量为1.2mg的条件下，观察不同浓度〔^{3}H〕B（0.2～5nM）与受体结合的关系，结果见表2及图1。



〔^{3}H〕皮质酮浓度(nM)

图1　〔^{3}H〕皮质酮浓度对结合值的影响——受体饱和曲线

表2　〔^{3}H〕B浓度与结合值的关系

总管计数及浓度 dpm	nM	总结合计数 dpm	非特异结合计数 dpm	特异结合计数及浓度 dpm	nM
5092	0.229	2766	180	2586	0.0193
7331	0.33	4129	1027	3102	0.023
20140	0.90	9596	1103	8493	0.063
39831	1.79	17420	3755	13665	0.1025
64742	2.91	23738	4882	18856	0.1414
116000	5.2	27646	6556	21092	0.1580

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结果表明，在本实验条件下，特异结合值随着〔^{3}H〕B浓度的增加渐呈饱和。反映了受体结合的可饱和特性。

2．胞液皮质酮受体的最大结合容量及平衡解离常数：将以上实验中测得的数值换算成〔^{3}H〕B特异结合量（B）和游离〔^{3}H〕B浓度(F)，进行Scatchard作图（图2），经直线回归分析，测算结果为，Bmax＝210.7fmol/mg·Prot，kd＝1.07nM。在所用〔^{3}H〕B浓度范围内，Scatchard制图为一直线，其相关系数（r）的绝对值为0.979，在统计学上非常显著。

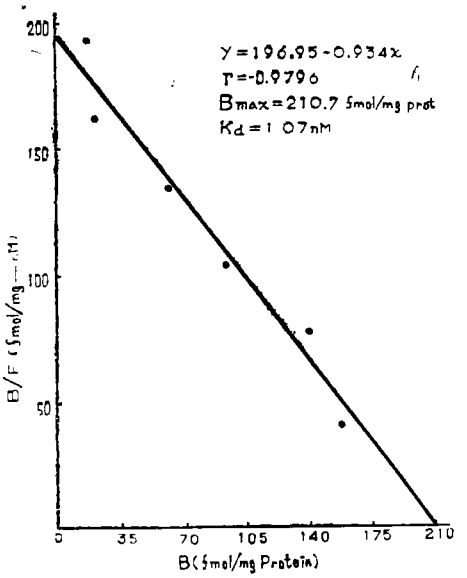


图2　〔^{3}H〕皮质酮对大鼠海马胞液皮质酮受体的直线Scatchard图

3．受体结合的特异性：结果见表3。

表3　不同类固醇与受体结合的相对亲和力

类固醇	IC50值(nM)	相对结合亲和力%
皮质酮	4.1±0.5	100±12
皮质醇	5.9±0.3	68.2±4.2
孕　酮	16±1	25.2±1.2
醛固酮	22.5±2.5	18.2±4.2
地塞米松	35±5	11.5±0.5

表中数值为均值±标准误，n＝20

结果表明，皮质酮受体与几种结构类似的类固醇化合物结合的相对亲和力依次为：皮质酮>皮质醇>孕酮>醛固酮>地塞米松。

二、pCPA对海马胞液皮质酮受体数量的影响

1．海马内5-HT含量的变化：实验组（pCPA组）由双侧脑室注射pCPA 1 mg/20μl，对照组（NS组）由双侧脑室注射生理盐水20μl，注射后4天断头，分离出海马，测定海马5-HT含量，结果见表4。

表4　pCPA对大鼠海马5-HT含量(ng/mg组织)的影响

分组	N	5-HT含量	%
NS	10	0.66±0.031	100±1.6
pCPA	10	0.34±0.082**	52±4

表中数值为均值±标准误，N为动物数，

** $p<0.01$

2．海马胞液皮质酮受体数量的变化：实验和对照动物经侧脑室注入pCPA溶液1 mg/20μl或生理盐水20μl。于注射后2天摘除双侧肾上腺，注射后4天断头处死动物，进行受体测定。计算各组受体的Bmax和kd值，结果见表5。

表5　pCPA对大鼠海马胞液皮质酮受体数量的影响

分组	N	Bmax(fmol/mg·Prot)	%
NS	23	243±16	100±6.9
pCPA	26	361±12.9**	148±5.3

** $p<0.01$

结果表明，侧脑室注射pCPA 1 mg，可使胞液受体的结合容量明显升高（$p<0.01$），若以对照组受体Bmax为100%，实验组平均升高了48±5.3%。但两组受体的kd值无明显差别。

讨　论

本工作参照有关文献[8][9]，以〔^{3}H〕B为放射性配体，建立了海马胞液皮质酮受体的放射配体结合测定法。结果表明，本法测得的皮质酮受体具有可饱和性、有限的结合能力（Bmax为243±16 fmol/mg·Prot）和高亲和力（kd值为1.1±0.12nM）。Scatchard作图为一直线，表明测得的皮质酮受体是一个或一组kd值十分接近的受体。比较几种不

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

同类固醇与受体结合的相对亲和力可以看出，受体结合具有高度的立体特异性，内源性糖皮质激素，皮质酮和皮质醇对受体结合的亲和力最高，孕酮与受体亦有一定的亲和力，这与孕酮可作为糖皮质激素受体的拮抗剂的观点相一致[10]。而醛固酮和地塞米松对受体的亲和力最低，这与Vedhuis等人的实验结果类似[11]。

大量资料表明，海马胞液皮质酮受体的一个显著特点是其数量易受多种激素和递质的影响，具有极大的可塑性[12][13]。大鼠脑室注射5,7-双羟色胺（5,7-DHT）或损毁中缝核，破坏脑内5-HT能系统，可使海马胞液皮质酮受体最大结合容量升高50%，表明脑内5-HT能系统在结构上的完整是维持海马皮质酮受体数量恒定的一个重要因素[14]。为证实脑内5-HT能神经系统的功能性活动对海马皮质酮受体数量的影响，本实验选用pCPA处理动物，发现降低海马5-HT含量后，海马胞液皮质酮受体结合容量显著增加，出现受体的向上调节现象（up-regulation）。与5,7-DHT相比，pCPA可特异性抑制色氨酸羟化酶的活性，选择性降低脑内5-HT含量，在削弱5-HT能神经元的功能性活动的同时，不破坏脑内5-HT能神经元的正常结构，对其它神经递质的含量不发生显著影响[15]，故本实验进一步证明海马5-HT能神经系统的功能性活动可影响海马胞液皮质酮受体数量。有关药理学实验的方法亦表明，应用5-HT受体的激动剂、拮抗剂或阻断5-HT重摄取的药物后，可在短时间内改变海马胞液皮质酮受体的结合容量，从另一个侧面反映了脑内5-HT能神经系统的功能活动对皮质酮受体数量的调节作用[14]。目前关于这种受体调节的生理学意义尚待深入研究。

参考文献

1. Knizey MJ. The hippocampus and septal area as primary target site for corticosterone. J Neurochem 1972;19:2737～2745
2. Veldhuis HD, et al. The adrenal steroid receptor in rat hippocampus. In: Endroczi E. (eds), Integrative Neurohumoral Mechanism. 1983;pp157～164
3. De Kloet ER, et al. The glucocorticoid receptor system in rat hippocampus. In: Endroczi E. (eds), Integrative Neurohumoral Mechanism 1983;pp147～155
4. Siegel RA, et al. Hippocampal cell nuclear binding of corticosterone following 5,7-dihydroxytryptamine. Molecular Cell Endo 1983;31:253～259
5. Scatchard G. The attraction of protein for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 1949;51:660～672
6. Hollenberg MD. Receptor models and action of neurotransmitters and hormones. In: Enna HI. (eds), Neurotransmitter receptor binding. 1978;pp13～39
7. Curzon G, et al. Rapid method for the determination of 5-hydroxytrypotamine and 5-hydroxyindoaectic acid in small regions of rat brain. Brit J Pharmacol 1970;39:653～655
8. De Kloet ER, et al. Differences in corticosterone and dexamethason binding to rat brain and pituitary. Endocrinology 1975;96:598～609
9. 徐仁宝，等。去肾上腺大鼠肝胞液糖皮质激素受体的测定。第二军医大学学报，1981；2（3）：161～165
10. Bohus B, et al. Antagonism by progesterone, dexamethasone and deoxycorticosterone of a specific effect of corticosterone. Life Sci 1981;28:433～440
11. Veldhuis HD, et al. Specificity of the adrenal steroid receptors system in rat hippocampus. Endocrinology 1982;110:2044～2051
12. Tornello S, et al. Regulation of glucocorticoid receptor in brain by corticosterone treatment of adrenalectomized rat. Neuroendo 1982;35:411～419
13. Angelucci L, et al. Serotoninergic innerva-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tion and glucocorticoid binding in the hippocampus. In: Bohus B. (eds), Typical and Atypical Antidepressants. 1982:pp365～370

14. Patachioli L, et al. Variation of hippocampus cytosol glucocorticoid binding capacity as an after effect of physiological increase in brain and blood corticosterone concentrations. In: Endroczi E. (eds), Integrative Neurohumoral Mechanism. 1983:pp165～172

15. 韩济生，等。中枢神经介质概论。第二版，科学出版社，1980：178～184

Effects of Para-chlorophenylalanine on Corticosterone Receptor Binding Capacity of Hippocampal Cytosol in Adrenalectomized Rats

Yan He, et al (Department of Physiology, Third Military Medical College)

The properties of the corticosterone receptors and the effects of para-chlorophenylalanine (pCPA) on the binding capacity of the corticosterone receptors of the hippocampal cytosol in adrenalectomized rats were investigated with receptor radioligand binding assay (RLA) using (^{3}H)-corticosterone as the ligand. It was fonud that the corticosterone receptors possessed the properties of saturability, limited binding capacity, high affinity and high specificity. RLA demonstrated a linear Scatchard plot, which implies that there is only one receptor or one group of receptors with similar Kd values. Four days after intracerebroventricular injection of 1 mg of pCPA, the hippocampal concentration of 5-HT was markedly decreased, and the binding capacity of the cytosol receptors was increased, which implies that the functional activity of the serotoninergic system in the hippocampus is an important factor in the control of the number of corticosterone receptors in rats.

Key words: Hippocampus; Corticosterene; Receptor; 5-HT; Para-chlorophenylalanine; Corticosterone; Receptor radioligand binding assay

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net